



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 096 449** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 1/14**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5047644/13, 09.04.1992

(46) Date of publication: 20.11.1997

(71) Applicant:  
Institut botaniki im.N.G.Kholodnogo AN  
Ukrainy (UA)

(72) Inventor: Daniljak Nikolaj Il'ich[UA],  
Reshetnikov Sergej Vasil'evich[UA]

(73) Proprietor:  
Institut botaniki im.N.G.Kholodnogo AN  
Ukrainy (UA)

(54) **CULTURE MEDIUM FOR CULTIVATING BASIDIAL FUNGI WHICH ARE ENZYME COMPLEX PRODUCERS**

(57) Abstract:

FIELD: industrial microbiology and food industry. SUBSTANCE: active enzyme system producers which destruct lignocellulose stock are higher basidial fungi. Culture-medium contains organic carbon course such as extract of racemic residue resulting from boiling it with water in 1:3 ratio which maintain concentration of

reducing sugars in culture, 1-1.5 wt % monosubstituted ammonium phosphate, monosubstituted potassium phosphate, disubstituted potassium phosphate, magnesium sulfate and aqueous base. Solution of hop extract is used as inductor of oxidases and hydrolases in amount of 0.02 wt %. EFFECT: improved properties of the culture medium. 4 tbl

RU 2 096 449 C1

RU 2 096 449 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 096 449** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **C 12 N 1/14**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5047644/13, 09.04.1992

(46) Дата публикации: 20.11.1997

(56) Ссылки: 1. Zenowicz A., Trojanowski J., Orlicz B. Acta Biochim polon, 25, N 4, p. 369 - 378, 1978. 2. Gide O., Marbach J., Mayer A.M. Phytochemistry, 19, p. 2273 - 2275, 1980. 3. Hira A., Barnett S.M., Shieh C.H. Noteraico J., AF chE Symp. Ser., 74, p. 17 - 20, 1978. 4. SU, авторское свидетельство, 1325071, кл. C 12 N 1/14, 1987.

(71) Заявитель:

Институт ботаники им.Н.Г.Холодного АН  
Украины (UA)

(72) Изобретатель: Даниляк Николай Ильич[UA],  
Решетников Сергей Васильевич[UA]

(73) Патентообладатель:

Институт ботаники им.Н.Г.Холодного АН  
Украины (UA)

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ-ПРОДУЦЕНТОВ  
КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ

(57) Реферат:

Использование: в области биотехнологии производства ферментных препаратов соматических мицелиальных структур, может быть использовано в технической микробиологии и пищевой промышленности. Сущность изобретения: активными продуцентами ферментных систем, осуществляющих деструкцию лигноцеллюлозного сырья, являются высшие базидиальные грибы. Питательная среда для их культивирования содержит органический

углерод - экстракт виноградных выжимок, полученный кипячением их с водой в соотношении 1:3, обеспечивающий концентрацию восстанавливающих сахаров в готовой среде 1 - 1,5 мас.%, однозамещенный фосфат аммония, однозамещенный фосфат калия, двузамещенный фосфат калия, сульфат магния и водную основу. В качестве индуктора оксидаз и гидролаз используют раствор экстракта хмеля в количестве 0,02 мас.%. 4 табл.

RU 2 096 449 C1

RU 2 096 449 C1

Изобретение относится к области биотехнологии производства ферментных препаратов, соматических мицелиальных структур и может быть использовано в технической микробиологии и пищевой промышленности. В частности, для эффективной утилизации лигноцеллюлозного сырья целесообразно использовать ферментные системы, т. е. препараты, содержащие активные окислительные ферменты пероксидазы и монофенол-монооксигеназы, которые деполимеризуют фенилпропановые лигноструктуры, а также целлюлозолитические гидролазы, гидролизующие целлюлозополиетиновые соединения. Активными продуцентами таких ферментных систем являются высшие базидиальные грибы.

Известны питательные среды для культивирования высших базидиальных грибов и способы получения комплекса ферментов путем культивирования их на жидких питательных средах, содержащих процессы биосинтеза соединений фенольной природы, стимулирующие процессы биосинтеза ферментов. Так, например, добавление феруловой кислоты в концентрации 0,2  $\mu$ M при выращивании на глюкозоминеральной среде культур базидиомицетов, в частности *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota mutabilis*, стимулировало увеличение активности монофенол-монооксигеназы /1/. Описан способ получения внеклеточных монофенол-монооксигеназ, предусматривающий в режиме своей реализации добавление в питательную среду галловой, кофейной и таниновой кислот /2/. Однако большинство фенольных соединений в виде указанных выше кислот при введении в питательную среду для последующего культивирования существенно снижают уровень активности гидролаз, что значительно затрудняет получение ферментного комплекса, содержащего одновременно активные окислительные и целлюлозолитические ферменты, а также затрудняют осуществление технологического процесса в режиме прямой конверсии лигноцеллюлозных субстратов.

Распространен способ подготовки питательных сред и получения комплекса ферментов путем культивирования базидиального гриба *Polyporus versicolor* на жидкой питательной среде, предусматривающий введение в состав питательной среды фенольных соединений, стимулирующих биосинтез окислительных ферментов, в частности 2,5-ксилидина /2,5-диметилаланин-4-амино-0-ксилола/ в 50% этаноле, который добавляют в концентрации 4 10 М через 3 сут. после начала биотехнологического процесса. При таком режиме на 8 сут. процесса ферментации активности внеклеточной монофенол-монооксигеназы достигают двукратного увеличения по сравнению с контролем /3/.

Известна питательная среда /прототип/ для культивирования базидиальных грибов продуцентов комплекса ферментов /4/, обладающего монофенол-монооксигеназой, пероксидазой и целлюлазной активностями, представителем которых является, в частности, штамм *Pleurotus ostreatus*

ИМБФ-1300. Среда имеет следующий состав, г/л: однозамещенный фосфат аммония 1,8 2,0, однозамещенный фосфат калия 0,5 0,6, двузамещенный фосфат калия 0,3 0,4, сульфат магния 0,4 0,5 и лиофилизированный зеленый сок люцерны 10 20 в качестве источника углерода и стимулятора процессов биосинтеза.

Целью изобретения является расширение числа органических компонентов питательных сред, осуществляющих направленный процесс биосинтеза ферментов, интенсификация и удешевление технологического процесса культивирования высших базидиальных грибов.

С этой целью в предлагаемой питательной среде для культивирования базидиальных грибов:

*Pleurotus ostreatus* (Jacq.Fr.) Kumm.  
UMBF-1300

*Coriolus hirsutus* (Fr.) Quel. ИБК-338

*Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. ИБК-087

предлагается использовать в качестве индуктора оксидаз и гидролаз экстракт хмеля в количестве 0,02% при содержании в среде 1 1,5% восстанавливающих сахаров и следующим соотношении минеральных компонентов, г/л: однозамещенный фосфат аммония 1,3 1,9, однозамещенный фосфат калия 0,03 0,4, двузамещенный фосфат калия 0,2 0,3, сульфат аммония 0,3 0,6.

Основными физиолого-активными компонентами хмелевого экстракта являются хмелевые смолы. Последние делятся на так называемые мягкие и твердые. Легкие, в свою очередь, разделяют на а- и б-смолы, которые содержат горькую а-кислоту /гумулон/, горькую б-кислоту /лупулон/ и горькую г-кислоту /гумулинон/. Твердые смолы подразделяются на б-смолы и г-смолы.

Горькие а-кислоты, состоящие из смеси 6 гомологов, различаются химической структурой, в частности наличием радикала при втором атоме углерода энолформы циклогександиенового ядра, кетоформы и циклогексанового ядра. При их окислении образуются г-кислоты, имеющие пентоциклическую структуру и горькие а-кислоты, состоящие также из смеси 6 гомологов. Конечной степенью окисления а-кислот являются б-смолы, которые относятся к фракции твердых смол. При окислении горьких б-кислот образуются горькие б-смолы, имеющие пентоциклическую структуру. При дальнейшем их окислении образуются нерастворимые г-смолы. По количественному содержанию компоненты хмелевого экстракта располагаются в такой последовательности: горькие а-кислоты, б-фракция и б-смолы. Горькие а-смолы малорастворимы, и только при интенсивном кипячении происходит их трансформация в изо-а- смолы, которые хорошо растворимы в воде.

На процессы биохимической трансформации хмелевых экстрактов влияют прежде всего интенсивность перемешивания, температура и рН среды. При деполимеризации и окислении горьких б-кислот образуются продукты, хорошо растворимые в воде. Легкие смолы и б-смолы также хорошо растворимы и при кипячении переходят в раствор.

Другими важными компонентами хмелевого экстракта являются хмелевые

дубильные вещества, т.е. смесь полифенолов, состоящих из антоцианогенов, лейкоантоцианидов, флавоноидов и катехинов.

Хмелевые дубильные вещества хорошо растворимы в воде и активно реагируют с белковыми соединениями.

Хмелевое эфирное масло, содержащееся в хмелевом экстракте, представляет собой углеводороды и кислородосодержащие соединения терпенового ряда, которые, в свою очередь, являются интенсивными индукторами процессов биосинтеза.

Хмелевое эфирное масло растворимо в воде и легко улетучивается с водными парами. Под влиянием окислительных процессов происходит трансформация эфирных масел и изменение их физических и химических свойств.

Кроме приведенных соединений хмелевые экстракты содержат полисахариды, азотистые соединения, липиды и воска. Общая характеристика экстрактов хмеля характеризуется показателями, приведенными в табл. 1.

Практическая эффективность предложенной питательной среды иллюстрируется следующим примером.

Пример.

Путем последовательного растворения минеральных солей готовят питательную среду, содержащую в своем составе, г/л: однозамещенного фосфата аммония 1,3 1,9, однозамещенного фосфата калия 0,3 0,4, двухзамещенного фосфата калия 0,2 0,3 и сульфата магния 0,3 0,6. В среду добавляют экстракт виноградных выжимок, полученный кипячением виноградных выжимок с водой в соотношении 1: 3, из расчета 1 1,5% восстанавливающих сахаров в готовой питательной среде. Такую питательную среду разливают по 100 мл в колбы Эрленмейера емкостью 0,5 л и стерилизуют острым паром 30 мин при 0,1 МПа. Колбы с питательной средой охлаждают до комнатной температуры, стерильно вносят пипеткой экстракт хмеля в трех концентрациях 0,01, 0,02 и 0,05% и засевают чистой культурой:

*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm. UMBF-1300

*Coriolus hirsutus* (Fr.) Quel. ИБК-338

*Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. ИБК-087.

Контролем служила питательная среда, не содержащая хмелевого экстракта.

Результаты эксперимента приведены в табл. 2, 3, 4.

Приведенный пример экспериментальной проверки сущности предлагаемого

изобретения подтверждает достижение поставленной цели.

На основании осуществленного эксперимента предлагается питательная среда для культивирования базидиальных грибов продуцентов комплекса ферментов, содержащая органический источник углерода, однозамещенный фосфат аммония, однозамещенный фосфат калия, двухзамещенный фосфат калия, сульфат магния, воду, отличающаяся тем, что в ней в качестве органического источника содержится экстракт виноградных выжимок, полученный кипячением виноградных выжимок с водой в соотношении 1:3, обеспечивающий концентрацию восстанавливающих сахаров в готовой среде 1 1,5 мас. и дополнительно экстракт хмеля в количестве 0,02 мас. к готовой среде в качестве индуктора оксидаз и гидролаз.

Таким образом, предложенное техническое решение от противопоставляемого отличается тем, что в качестве индуктора биосинтеза оксидаз и гидролаз используют экстракт хмеля в количестве 0,02 мас. а в качестве источника углерода экстракт виноградных выжимок в количестве, обеспечивающем содержание восстанавливающих сахаров в готовой среде 1 1,5 мас.

Сравнение заявленного биотехнологического решения по созданию питательной среды с прототипом позволило установить соответствие его содержания критерию "Новизна". При изучении других известных решений в данной области биотехнологии признаки, тождественные заявляемому изобретению, не были выявлены. Исходя из этого, заявляемое биотехнологическое решение соответствует критерию "Существенные отличия".

#### Формула изобретения:

Питательная среда для культивирования базидиальных грибов-продуцентов комплекса ферментов, содержащая органический источник углерода, однозамещенный фосфат калия, двухзамещенный фосфат калия, сульфат магния, воду, отличающаяся тем, что она в качестве органического источника углерода содержит экстракт виноградных выжимок, полученный кипячением выжимок с водой в соотношении 1 3, обеспечивающий концентрацию восстанавливающих сахаров в готовой среде 1 1,5 мас. и дополнительно экстракт хмеля в количестве 0,02 мас. к готовой среде в качестве индуктора оксидаз и гидролаз.

55

60

Таблица 1

Наименование	Содержание % на а. с. м.
Общие смолы	53,8
Легкие смолы	40,6
Твердые смолы	13,2
Дубильные вещества	5,5

Таблица 2

Наименование фермента	Наименование субстрата	Единицы измерения	Активность фермента			
			Конт-роль	Содержание экстракта хмеля, %		
				0,01	0,02	0,05
Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) Kumm. UMBF-1300						
Пероксидаза	Бензидин	ед/л	следы	27,4	44,2	39,8
Монофенол-монооксигеназа	"-	"-	"-	25,7	39,2	34,6
1,4-β-эндоглюканаза	Натриевая соль КМЦ	% деполи-меризации	29,7	32,2	30,1	27,4
Экзо-1,4-β-глю-каназа	"-	мг % глюкозы	55,7	47,2	53,7	50,2
Полигалактуро-наза	Пектин свекловичный	ед/мл	162,1	137,1	146,7	143,2

Таблица 3

Наименование фермента	Наименование субстрата	Единицы измерения	Активность фермента			
			Конт-роль	Содержание экстракта хмеля, %		
				0,01	0,02	0,05
1	2	3	4	5	6	7
Coriolus hirsutus (Fr.) Quel. ИБК-338						
Пероксидаза	Бензидин	ед/л	следы	40,1	43,4	41,2
Монофенол-монооксигеназа	"-	"-	"-	29,2	35,4	30,1
Эндо-1,4-β-глюканаза	Натриевая соль КМЦ	% деполимеризации	31,0	19,2	22,6	21,0
Экзо-1,4-β-глюканаза	"-	мг % глюкозы	49,7	24,3	28,4	26,2
Полигалактуро-наза	Пектин свекловичный	ед/мл	151,2	130,1	137,0	131,0

Таблица 4

Наименование фермента	Наименование субстрата	Единицы измерения	Активность фермента			
			Конт-роль	Содержание экстракта хмеля, %		
				0,01	0,02	0,05
1	2	3	4	5	6	7
Coriolus versicolor (Fr.) Quel. ИБК-087						
Пероксидаза	Бензидин	ед/л	следы	13,2	17,2	16,5
Монофенол-монооксигеназа	"-	"-	"-	16,2	18,2	18,0
Эндо-1,4-β-глюканаза	Натриевая соль КМЦ	% деполимеризации	86,0	81,0	85,0	82,4
Экзо-1,4-β-глюканаза	"-	мг % глюкозы	110,0	94,2	130,2	100,7
Полигалактуро-наза	Пектин свекловичный	ед/мл	124,0	107,3	116,7	112,4